

ARTICULOS ORIGINALES

## SUPERSINCRONIZACION DEL CRECIMIENTO *IN VITRO* DEL *PLASMODIUM FALCIPARUM*

MARIA ORFA DE ROJAS\*, MOISES WASSERMAN\*, \*\*

Se logró un crecimiento "Super sincrónico" del parásito *Plasmodium falciparum* en cultivo, mediante la aplicación de tres tratamientos sucesivos: sorbitol (para destruir formas maduras), Percoll (para concentrar esquizontes) y nuevamente sorbitol, después de permitir la reinvación. En esta forma se obtuvo una población de parásitos con un rango de edad entre 0-3 horas, de los cuales el 99.1% fueron esquizontes a las 48 horas de incubación.

El desarrollo morfológico del parásito fue completamente normal después del tratamiento y su sincronía se controló estrictamente cada 4 horas en el primer ciclo.

### INTRODUCCION

La malaria, enfermedad causada por hemoparásitos del género *Plasmodium*, ha recrudecido en los últimos años y hoy es uno de los principales problemas de salud pública en los trópicos<sup>(1, 2)</sup>. Los frentes clásicos en la lucha contra la enfermedad, fumigación con insecticidas residuales para disminuir la población del vector y quimioterapia para reducir la infección y transmisión en el humano, han demostrado ser insuficientes contra la compleja biología del sistema y actualmente es alarmante la resistencia de los mosquitos a los insecticidas<sup>(3)</sup> y de los parásitos a los medicamentos<sup>(4, 5)</sup>. Es imperativo pues, el desarrollo de medios que permitan llevar a cabo estrategias de ataque diferentes.

Varios laboratorios en el mundo, entre ellos el nuestro, ven la posibilidad de usar las técnicas modernas de ingeniería genética para la producción en gran escala de antígenos<sup>(6, 7)</sup>. Además un conocimiento sólido de los procesos moleculares involucrados en la biosíntesis de los antígenos, permitirá el diseño de nuevas estrategias y la utilización de las técnicas ya mencionadas en forma más racional y con mayor probabilidad

de éxito. Sin embargo, en gran parte los estudios sobre el plasmodio se han realizado con especies que crecen naturalmente en forma sincrónica<sup>(8, 9)</sup>. En *Plasmodium falciparum* la falta de sincronía ha limitado los estudios en el campo de la síntesis de ácidos nucleicos. En cuanto a las proteínas debido a los métodos poco rigurosos usados en la sincronización, los resultados no son siempre inequívocos<sup>(10, 11)</sup>.

Con el propósito de suplir esta deficiencia, se desarrolló un método para sincronizar el crecimiento *in-vitro* de este parásito. Este método basado en una combinación de la destrucción de trofozoítos maduros por tratamiento con sorbitol<sup>(12)</sup> y la concentración de esquizontes con gradientes isopícnicos de Percoll<sup>(13)</sup>, permite obtener los cultivos de más alto sincronismo hasta hoy informados.

### MATERIALES Y METODOS

#### Cultivo de *Plasmodium falciparum*

Se usó la cepa colombiana FCB-2. Los parásitos fueron cultivados por el método de Trager y Jensen<sup>(14)</sup>, en cajas de Petri plásticas (Falcon, Oxnard - California). Se partió de una suspensión de eritrocitos al 5%

\* Grupo de Bioquímica - Instituto Nacional de Salud.

\*\*Profesor de Bioquímica - Universidad Nacional.

(v/v) en medio RPMI-1640 (Gibco-Grand Island, New York) al que se agregó buffer HEPES 25mM, NaHCO<sub>3</sub> 32mM, glutatión reducido 1mg/l., hipoxantina 0,2mM y suero humano inactivado de sangre O(+) 10% (v/v). Se cambió el medio 1 ó 2 veces diariamente dependiendo de la parasitemia del cultivo y del grado de madurez de los parásitos. Cada 3-4 días se llevó a cabo una dilución con suspensión fresca de eritrocitos. La parasitemia se controló por medio de extendidos teñidos con Giemsa.

### Eritrocito

Se usó sangre de donantes sanos tipo O(+). Se colectó la sangre sobre un décimo de volumen de solución CPD-A<sup>(15)</sup>, se conservó a 4°C, y se utilizó durante un período máximo de 21 días. Las células blancas se descartaron por centrifugación de la sangre completa sobre un cojín de Ficoll-Paque (Pharmacia-Fine Chemicals).

### "Super-sincronización" del cultivo

Se logró la "super-sincronización" del cultivo por medio de tres tratamientos sucesivos. El primero, con una solución de sorbitol<sup>(12)</sup> destruyó las formas maduras dejando una población de anillos de edad variable (rango de edad de 20 horas); se ajustó la parasitemia a un 5% y el desarrollo del cultivo se siguió durante 36 horas hasta que por lo menos un 1% de las células eran esquizontes. El cultivo fue entonces centrifugado en un gradiente de Percoll<sup>(13)</sup> y la fracción superior, que contenía solamente esquizontes en una parasitemia superior al 80%, se sembró en una suspensión fresca de eritrocitos al 5% (v/v) ajustando la parasitemia a un 2%. Se permitió la reinvasión por 3 horas al cabo de las cuales, un nuevo tratamiento con sorbitol eliminó los esquizontes que no habían reventado y dejó una población de anillos con un rango de edades inferior a 3 horas.

## RESULTADOS

### Obtención de un cultivo "super-sincrónico".

Se obtuvo un cultivo con un rango de edades inferior a 3 horas. El cultivo original asincrónico fue tratado con sorbitol<sup>(12)</sup> para eliminar los parásitos maduros y dejar una población heterogénea de anillos (formas jóvenes). Después de unas 36 horas, los esquizontes

fueron separados de las otras formas y concentrados por medio de un gradiente isopícnico de Percoll<sup>(13)</sup>. Se permitió la reinvasión por no más de 3 horas y se hizo un nuevo tratamiento con sorbitol que dejó un cultivo de anillos con un rango de edades inferior a 3 horas. En la figura 1 se describe el proceso de maduración de ese cultivo. Durante las primeras 20 horas todos los parásitos se encuentran como anillos. A las 24 horas abruptamente entran todos en el estadio de trofozoítos maduros. Entre las 36 y 38 horas empiezan a segmentar y en cada uno se ven unos pocos núcleos. A las 48 horas sólo hay esquizontes y comienzan a aparecer unos pocos anillos que logran ya desarrollarse en eritrocitos después de reinvasión. Este proceso de maduración sincrónica se ilustra en la figura 2, con fotomicrografías de extendidos coloreados con giemsa; de esquizontes concentrados en gradientes de Percoll (2a) y parásitos sincrónicos con edades de 12 (2b), 24 (2c), 36 (2d), 40 (2e) y 48 horas (2f).

## DISCUSION

El *Plasmodium falciparum* se desarrolla *in-vitro* asincrónicamente, es decir en un momento dado la población es heterogénea en cuanto a la edad de los parásitos y es posible encontrarlos en cualquiera de las etapas de desarrollo: anillos, trofozoítos, esquizontes y aún merozoítos libres. Para obtener un cultivo en el cual creciera una población de parásitos con un rango de edades muy cercano se aplicaron sucesivamente tratamientos con sorbitol - Percoll - sorbitol. La destrucción inicial de las formas maduras dejó una población de anillos cuyas edades pueden variar entre 0 y 20 horas, lo cual implica un crecimiento asincrónico en pocas horas. Fue así como en 36 horas se recuperó una población de esquizontes del 1% que se concentró mediante un gradiente isopícnico de Percoll. En este momento se permitió la reinvasión por 3 horas y se aplicó el segundo tratamiento con sorbitol. De esta forma se asegura que todos los parásitos tienen edades en un rango de 0-3 horas. El mérito de este procedimiento radica precisamente en haber logrado limitar el rango de edad de los parásitos tal como lo muestran las figuras 1 y 2.

Nosotros creemos que nuestro procedimiento para sincronizar el crecimiento *in-vitro* del *Plasmodium falciparum*, tiene ventajas sobre otros procedimientos en los que se reporta sincronía después de sucesivos tratamientos con sorbitol<sup>(16)</sup>, puesto que como ya se dis-

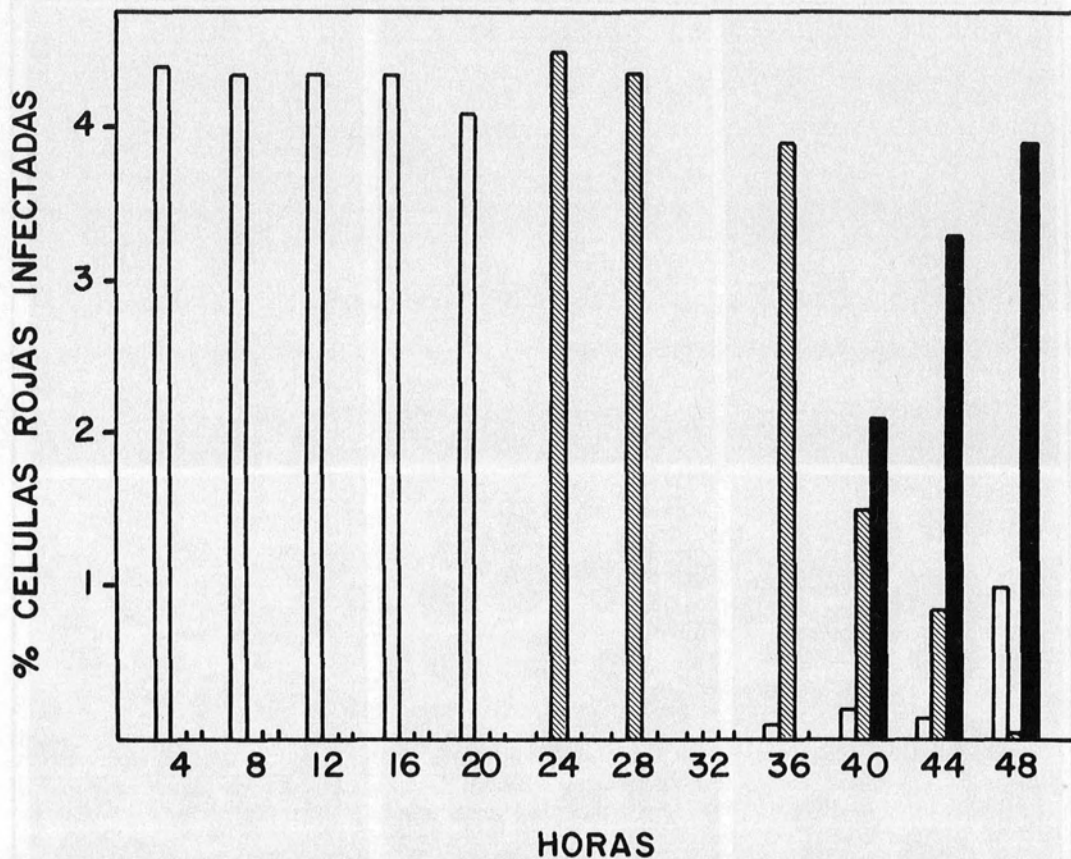


Fig. 1. Super-sincronización de un cultivo de *Plasmodium falciparum*.

El porcentaje de células rojas parasitadas con anillos (□), trofozoitos (▨) y esquizontes (■) se evaluó por medio de extendidos periódicos (cada 4 horas) en un cultivo super-sincronizado de *Plasmodium falciparum*.

cutió es difícil obtener poblaciones de parásitos con pequeñas diferencias de edad utilizando sorbitol solamente.

En otros trabajos, se reporta la obtención de cultivos sincrónicos de *P. falciparum* después de tratar el cultivo asincrónico con colchicina por 24 horas<sup>(17)</sup>. Sin embargo, por un lado los resultados mostrados indican un crecimiento mucho menos sincrónico que el obtenido en nuestro laboratorio y al final de cada ciclo se reporta una mezcla de 10% de anillos, 30% de trofozoitos y 60% de esquizontes. En nuestro caso, a las 48 horas el 99.1% fueron esquizontes y el 0.9% anillos.

Por otro lado aunque no se conoce muy bien el mecanismo de acción de la colchicina, se sabe que

actúa a nivel de los microtúbulos en sistemas eucariotes y su efecto no es reversible<sup>(18)</sup>.

Recientemente, se publicó otro trabajo en el cual se plantea la sincronización en cultivo del *Plasmodium falciparum*, usando afidicolina<sup>(19)</sup>. Este compuesto es un inhibidor de la síntesis de DNA. Cuando es agregado a parásitos jóvenes, permite su desarrollo hasta el momento en que comienza la síntesis de DNA. Si se permite que todos los parásitos lleguen al mismo estado de madurez y se libera el bloqueo, es de esperar que toda la población crezca sincrónicamente; los autores obtuvieron una población de parásitos con un rango de edades de 0 a 5 horas. Este procedimiento de sincronización puede tener mucha aplicación en la tarea de recolectar grandes cantidades de merozoitos en una forma quizás menos laboriosa y en tiempos

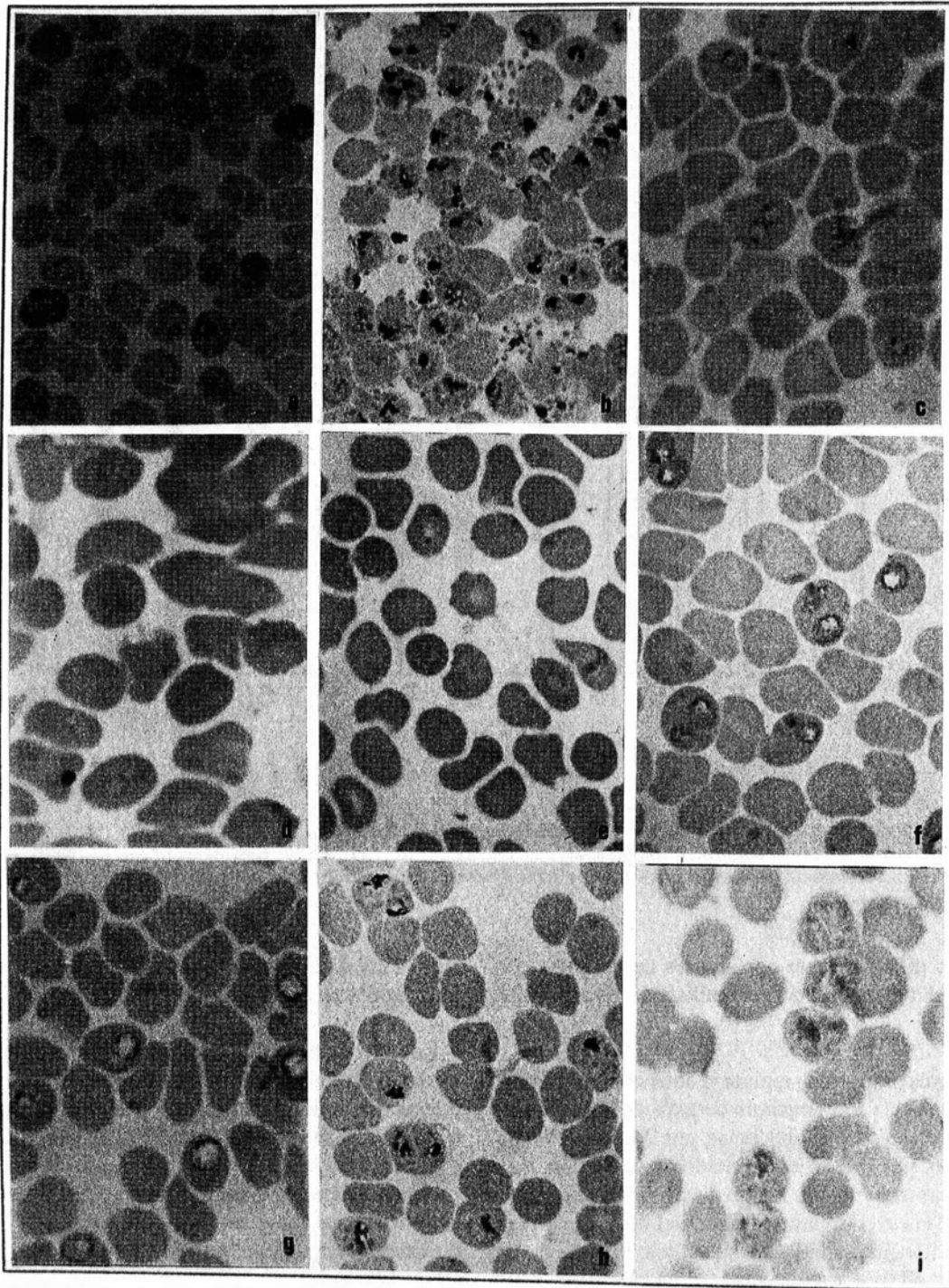


Fig. 2. Fotomicrografías del proceso de maduración en un cultivo super-sincrónico de *Plasmodium falciparum*.

El cultivo fue super-sincronizado según se describió. Las fotomicrografías muestran en a) el proceso de concentración de esquizontes, en b) anillo de 12 horas de edad, en c) y d) trofozoítos de 24 y 36 horas y en e) y f) esquizontes de 40 y 48 horas respectivamente. (x 1500 aumentos).



relativamente cortos. Sin embargo, es un tratamiento poco llamativo si se quiere estudiar la síntesis de DNA por los parásitos como era nuestro caso. Una de las razones es que aunque se habla de su reversibilidad, se corre el riesgo de que residuos de la droga sigan actuando sobre el parásito y la síntesis se vea afectada. Además, se plantea que aunque aparentemente la síntesis de DNA se detiene en trofozoítos tempranos al aplicar una concentración dada de la droga, realmente el proceso no se detiene sino que continúa lentamente<sup>(19)</sup>. Este aspecto y su efecto sobre la sincronización del parásito tampoco han sido estudiados.

Nuestro procedimiento de sincronización es sencillo, las parasitemias logradas fueron relativamente altas (5%) y pueden incrementarse aún más si se parte de un volumen inicial de cultivo más alto; en este caso se usaron 72ml de cultivo solamente.

Por otro lado, el desarrollo morfológico del parásito fue completamente normal después del tratamiento. La sincronía de los parásitos obtenidos con nuestro procedimiento, se controló estrictamente cada 4 horas durante el primer ciclo, en el que se midieron las velocidades de síntesis de DNA, RNA y proteínas del parásito<sup>(20)</sup>. Un control menos riguroso se hizo en el segundo ciclo; sin embargo, se observó que por lo menos hasta el estadio de trofozoítos tempranos, el crecimiento continuó uniformemente. Esto comprobó que la población de parásitos utilizada estaba realmente dentro de un rango de edades muy estrecho. Quizás para otro tipo de estudios sea interesante observar la duración de la sincronía del parásito después del tratamiento con Sorbitol-Percoll-Sorbitol.

### SUMMARY

A stringently synchronized growth of *Plasmodium falciparum* was achieved by three successive treatments: with sorbitol, the mature forms were destroyed; a Percoll isopycnic gradient concentrated the schizonts, and a new sorbitol treatment after reinvasion, left a population of parasites with an age range of 3 hours. After 48 hours of incubation 99.1% were schizonts.

The morphology of the developmental forms was completely normal after treatment; their synchrony was controlled every 4 hours during the first cycle.

### AGRADECIMIENTOS

Al señor Jaime Vega por su magnífico trabajo fotográfico.

### BIBLIOGRAFIA

1. XX conferencia Sanitaria Panamericana Boletín PAHO. 1978; 85: 478-479.
2. Flórez, D. Epidemiología del *Plasmodium falciparum* en Colombia. Documento Servicio Erradicación de la Malaria, Minsalud, Bogotá 1983.
3. Gabaldón A. Los Servicios sanitarios y el desarrollo socioeconómico en la América Latina. Bol. Inf. de la Dirección de Malariología y Saneamiento Ambiental (Venezuela) 1970; 10: 37.
4. Young D, Moore C. Chloroquine resistance in *Plasmodium falciparum* Am J Trop Med Hyg 1961; 12: 401-405.
5. Arias AE, Espinal C, Guerra P, Cortés G. Susceptibilidad *in-vivo* e *in-vitro* del *Plasmodium falciparum* a las drogas antimaláricas en algunas regiones de Colombia. Acta Médica Colombiana 1982; 7: 365.
6. Gomen M, Langsley G, Hyde JE, Yankovsky, NK, Zolg, JW, and Scaife JG. The establishment of genomic DNA libraries for the human malaria parasite *Plasmodium falciparum* and identificación of individual clones by hybridization. Mol Biochem Parasitol 1982; 5: 391-400.
7. Kemp RJ, Coppel RL, Cown AF, Saint RB, Brown GV, anders RF. Expression of *Plasmodium falciparum* blood stage antigens in *Escherichia coli*. Detection with antibodies from immune humans: Proc Natl Acad Sci, USA 1983; 80: 3787-3792.
8. Sherman IW, Biochemistry of *Plasmodium* (malaria parasite). Microb Rev 1979; 48: 453-495.
9. Conclin KA, Chou S, Siddigui WA, Schnel JU. DNA and RNA synthesis by intraerythrocytic stages of *Plasmodium knowlesi*. J Protozool 1973; 20: 683-688.
10. Kilejian A. Stage specific proteins and glycoproteins of *Plasmodium falciparum*: identification of antigens unique to schizonts and merozoites. Proc Natl Acad Sci USA 1980; 77: 3695-3699.
11. Myler P, Saul A, Kidson C. The synthesis and fate of stage specific proteins in *Plasmodium falciparum* cultures. Mol Biochem Parasitol 1983; 9: 37-45.
12. Lambros C, Vanderberg JP. Synchronization of the *Plasmodium falciparum* erythrocytic stages in culture. J Parasitol. 1979; 65: 418-420.

13. Rivadeneira ME, Wasserman M, and Espinal C. Separation and concentration of schizonts of *Plasmodium falciparum* by Percoll gradients. J Protozool. 1983; 30: 367-370.
14. Trager W, Jensen JB. Human malaria parasites in continuous culture. Science 1976; 193: 673-675.
15. Capps CT, Jensen JB. Storage requirements for erythrocytes used to culture *Plasmodium falciparum*. J Parasitol 1983; 69: 158-162.
16. Deans JA, Thomas AW, Inge, PMG, Cohen S. Stage specific proteins synthesis by asexual blood stage parasite of *Plasmodium falciparum*. Mol Biochem Parasitol 1983; 8: 45-51.
17. George SN, Hui Palmer KL, Siddiqui WA. Synchronization of *P. falciparum* in continuous *in-vitro* culture: use of colchicine. Am J Trop Med Hyg 1983; 32: 1451-1453.
18. Pardae AB, Dubrow R, Hamlin JL, Kletzien RF. Animal cell cycle. Ann Rev Biochem 1978; 47: 715-750.
19. Inselburg J, Banyll HS. *Plasmodium falciparum* synchronization of asexual development with aphidicolin, a DNA synthesis inhibitor. Exp Parasitol 1984; 57: 48-54.
20. De Rojas MO, Wasserman M. Temporal relationships of macromolecular synthesis during the asexual cell cycle of *Plasmodium falciparum*. Trans Roy Soc Trop Med Hyg 1985; 79: 792-796.